

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 21/66, 33/52 // 33/58</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/25853</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. November 1994 (10.11.94)</p>									
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/01328</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 27. April 1994 (27.04.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">P 43 14 547.7</td> <td style="width: 33%;">3. Mai 1993 (03.05.93)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>P 43 32 697.8</td> <td>25. September 1993 (25.09.93)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>P 44 01 577.1</td> <td>20. Januar 1994 (20.01.94)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEMT, Volker [DE/DE]; Am Fischanger 3, D-82362 Weilheim (DE). MÜLLER, Günter [DE/DE]; v.-Bodenschwingh-Weg 6; D-82380 Pei- senberg (DE). NEUMANN, Ulrich [DE/DE]; St.-Anna-Weg 8, D-82362 Weilheim (DE). GIESEN, Ursula [DE/DE]; Am Eselsberg 9, D-82362 Weilheim (DE). HOYLE, Nicholas [GB/DE]; Bräuhäusstrasse 25, D-82327 Tutzing (DE).</p> <p>(74) Anwälte: KOLB, Bernd usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstrasse 116, D-68298 Mannheim (DE).</p>			P 43 14 547.7	3. Mai 1993 (03.05.93)	DE	P 43 32 697.8	25. September 1993 (25.09.93)	DE	P 44 01 577.1	20. Januar 1994 (20.01.94)	DE
P 43 14 547.7	3. Mai 1993 (03.05.93)	DE									
P 43 32 697.8	25. September 1993 (25.09.93)	DE									
P 44 01 577.1	20. Januar 1994 (20.01.94)	DE									
<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, FI, JP, KR, NO, NZ, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i></p>											
<p>(54) Title: ELECTROCHEMILUMINESCENT PROCESS</p> <p>(54) Bezeichnung: ELEKTROCHEMILUMINESZENZVERFAHREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="margin-left: 20px;">Process for measuring electrochemiluminescent phenomena by using certain detergents and if required alkali chlorides, as well as appropriate reagents therefor.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="margin-left: 20px;">Verfahren zur Messung elektrochemilumineszenter Phänomene unter Verwendung von bestimmten Detergenzien und gegebenenfalls Alkalichloriden sowie dafür geeignete Reagenzien.</p>											

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Elektrochemilumineszenzverfahren

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Messung elektrochemilumineszenter Phänomene, Verfahren zum Nachweis eines Analyten mittels solcher Verfahren, Reagenzlösungen, die in diesen Verfahren eingesetzt werden können und ein für die Durchführung des Verfahrens besonders geeigneter Apparat.

Verfahren zur Messung elektrochemilumineszenter Phänomene sind seit einigen Jahren bekannt. Bei solchen Verfahren wird die Fähigkeit von speziellen Metallkomplexen ausgenutzt, durch Oxidation in einen Zustand zu gelangen, von dem aus sie unter Abgabe von elektromagnetischer Strahlung in einen Grundzustand zurückfallen. Solche Verfahren und dafür geeignete Metallkomplexe sind beispielsweise in der WO 86/02734 beschrieben.

Diese Technologie wurde immer weiter verfeinert. In der WO 90/05296 wird der Testzusammensetzung ein Amin zugesetzt, bevorzugt Tripropylamin, das in oxidierte Form ein starkes Reduktionsmittel darstellt. Die elektrochemische Reaktion findet in einem Elektrolyten statt, in dem der Elektrochemilumineszenz (ECL)-Rest, d. h. der zur Abgabe von elektromagnetischer Strahlung befähigte Metallkomplex, und das Amin oxidiert werden können. Als geeigneter Elektrolyt in wässriger Lösung wird Phosphatpuffer bei einem pH von 6 - 9, bevorzugt 7 - 7,5, beschrieben.

In der WO 90/05302 wird zu dieser Testzusammensetzung zur Erhöhung der elektromagnetischen Strahlung das Detergenz Triton X-100 oder Triton N-401 zugesetzt. In der WO 90/05411 wird eine Verbesserung des Apparates zur Messung von ECL beschrieben.

Ferner gelang es, die Technologie zum Nachweis von Analyten einzusetzen, indem Elektrochemilumineszenzmarkierungen an Analyten, Analytanaloge oder analytspezifische Substanzen gekoppelt wurden. Die Elektrochemilumineszenz wurde zur Bestimmung der Menge des anwesenden Analyten verwendet. Insbesondere wurden Immunoassays beschrieben, bei denen die üblichen Markierungen durch elektrochemilumineszente Markierungen ersetzt sind.

Weitere Verbesserungen und Anwendungen der Technologie sind in WO 87/06706, WO 89/04392, WO 89/10552, WO 89/10551, WO 90/05301 und WO 90/11511 beschrieben. Die Offenbarungen in den genannten Publikationen werden im folgenden vorausgesetzt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, die vorbekannten Verfahren zu verbessern, insbesondere im Hinblick auf die Empfindlichkeit der Analytnachweise, die mit der Elektrochemilumineszenztechnologie möglich sind.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Messung elektrochemischer Phänomene in einer Lösung oder an einer an eine Lösung angrenzende feste Phase, wobei die Lösung ein Detergenz ausgewählt aus der Gruppe der Fettalkohol-ethoxylate, Plantaren und Octylglucosid oder ein Gemisch hiervon enthält.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten mit Hilfe dieser Verfahren sowie geeignete Reagenzien zur Durchführung des genannten Verfahrens.

Bei dem Erfindungsgegenstand handelt es sich um eine Lehre, die auf dem oben genannten Stand der Technik aufbaut. Die allgemeinen Grundlagen elektrochemilumineszenter Verfahren sind in diesem Stand der Technik ausführlich beschrieben. Geräte zur Durchführung von Messungen der Elektrochemilumineszenz enthalten eine Meßeinheit mit einem Behälter für eine Reagenzlösung, mindestens zwei Elektroden (eine Arbeits- und eine Gegenelektrode), die während der Messung mit der Reagenzlösung in Kontakt stehen und einen Detektor zur Messung des durch die Elektrochemilumineszenz erzeugten Lichtes. Generell wird bei diesen Verfahren zunächst an die Lösung eine Ausgangsspannung (Präpolarisation) angelegt. Anschließend wird diese Spannung über das Redoxpotential einer in der Lösung enthaltenen Substanz, z. B. einem Amin, erhöht. Über die dadurch oxidierte Substanz wird ein zur Chemilumineszenz fähiges Material, z. B. bestimmte Ruthenium-Komplexe zur Aussendung von Licht angeregt. Das innerhalb einer bestimmten Zeit vom Detektor aufgefangene Licht ist ein Maß für die Anwesenheit der Menge des elektrochemilumineszenten Materials. Sofern es sich bei dem elektrochemilumineszenten Material um eine Markierung für einen Analyten, einen Analytanalogen oder eine analytspezifische Substanz, z. B. in einem Immunoassay, handelt, ist das empfangene Licht ein Maß für die Anwesenheit des Analyten.

Es hat sich gezeigt, daß das aus der WO 90/05302 bekannte und bisher üblicherweise zugesetzte Detergenz Triton X-100, das in der Praxis meist in Kombination mit dem Detergenz Tween 20 eingesetzt wurde, nicht optimal ist. Einerseits ist Triton X-100 schlecht abbaubar und damit nicht umweltverträglich. Zum anderen wurde überraschenderweise gezeigt, daß ganz bestimmte andere Detergenzien im Vergleich zu Triton X-100 zur Verbesserung des ECL-Verfahrens führen. Mit diesen speziellen Detergenzien wird eine erhöhte Signalausbeute, ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis und damit eine erhöhte Sensitivität des Nachweisverfahrens und eine Erniedrigung der unteren Nachweisgrenze sowie eine bessere Präzision erreicht.

Als geeignet haben sich die Detergenzien ausgewählt aus der Gruppe der Fettalkoholethoxylate, worunter zum Beispiel Polidocanol (Dodecylpoly-(ethylenglycolether)_n), C14-E09 (Poly(ethylenglycol-ether)_n), Genapol (Isotridecylpoly(ethylenglycolether)_n), C8-E09 (Octylalkoholpoly(ethylenglycolether)_n) zu verstehen sind, Plantaren® (Alkylpolyglucosid) und Octylglucosid (Octyl-beta-D-glucopyranosid) oder ein Gemisch hiervon, erwiesen. Die Detergenzien werden in Konzentrationen von 0,001 bis 1,0 % eingesetzt. Die am besten geeignetste Konzentration kann für jedes Detergenz leicht ermittelt werden. Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 % haben sich am geeignetsten erwiesen.

Zur Konservierung wurde bisher der Testzusammensetzung Natriumazid üblicherweise in einer Konzentration von 5 - 10 mM zugesetzt. Es hat sich gezeigt, daß dieses umweltschädliche Agens durch Bioban oder Oxaban ersetzt werden kann, die weitaus umweltverträglicher als Azid sind.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß diese Konservierungsmittel einen weiteren positiven Effekt auf das ECL-Verfahren ausüben. Im Vergleich zu Azid wird eine Erhöhung des Messignals beobachtet. Oxaban und Bioban werden dabei in Konzentrationen von 0,01 bis 1 %, bevorzugt 0,1 bis 0,5 % eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Messung elektrochemischer Phänomene in einer Lösung oder an einer an eine Lösung angrenzenden festen Phase kann bei Temperaturen durchgeführt werden, die über dem Gefrierpunkt der Lösung liegen, aber niedriger als 40°C sind.

Eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit kann erreicht werden, indem an die Meßeinheit eine Spannung angelegt wird, deren Verlauf über die Zeit rechteckig ist. Dies bedeutet, daß ausgehend von der Ausgangsspannung ein unmittelbarer Anstieg der Spannung (innerhalb maximal 0,4 Sekunden) auf die Endspannung vorgenommen wird. Für die Anregungszeit wird diese Spannung im wesentlichen konstant gehalten. Nach dieser Zeit wird die Spannung wieder unmittelbar auf eine Spannung unter dem Redoxpotential des Systems zurückgeführt. Durch diese Maßnahme ergibt sich außerdem eine Verbreiterung des dynamischen Meßbereiches, das heißt, des Bereiches, innerhalb dem Analytkonzentrationen eines festgelegten Immunoassays gemessen werden können. Für den Fall niedriger Temperaturen ist ein Salzzusatz bevorzugt.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die an die Arbeitselektrode angelegte Rechteck-Endspannung (verglichen mit Ag/AgCl) auf einen Maximalwert zwischen dem Redox-Potential

der oxidierbaren Substanz und 2,2 Volt zu begrenzen. Besonders bevorzugt ist eine Spannung zwischen 1,2 - 2,2 Volt. Besonders bevorzugt sind 1,4 Volt. Diese Werte gelten für die Verwendung eines Platin- bzw. Gold-Elektrodenpaars.

Falls die bisher übliche Rampenspannung, beispielsweise eine Dreiecksspannung, angelegt wird, wird die Endspannung (verglichen mit Ag/AgCl) auf einen Maximalwert von 3,0 Volt begrenzt.

Überraschenderweise konnte auch eine Erhöhung des Signals erreicht werden, indem die Ausgangsspannung vor Anregung der Elektrochemilumineszenz an der Arbeitselektrode zwischen + 400 und - 400 mV, verglichen mit einer Ag/AgCl-Elektrode, betrug. Besonders bevorzugt ist ein Wert zwischen + 0 mV und + 200 mV. Auch hier gelten die Werte für die Verwendung eines Platin- bzw. Goldelektrodenpaars. Die Potentiale für andere Elektrodenmaterialien können leicht errechnet werden.

Ebenfalls eine Steigerung des Signals läßt sich erreichen durch Einstellung eines pH-Wertes zwischen 6,5 - 9,0, bevorzugt zwischen 6,5 - 7,5, besonders bevorzugt 6,8. Dies geschieht zweckmäßigerweise durch Einsatz eines für den Bereich geeigneten pH-Puffers. Zusätzlich können noch ein oder mehrere Alkali- oder Erdalkalihalogenide in einer Konzentration von 0,05 mmol/l bis 0,5 mol/l in der Lösung enthalten sein. Bevorzugt wird Natriumchlorid eingesetzt.

Die oben genannten Maßnahmen führen alleine schon zu erheblichen Verbesserungen der bekannten Verfahren. Darüber hinaus jedoch kann die Empfindlichkeit oder/und der

- 7 -

dynamische Meßbereich von Analytnachweisen durch eine Kombination der Maßnahmen in besonders großem Umfang gesteigert werden.

Die Steigerung der Nachweissensitivität von Analyten, beispielsweise in Immunoassays, wie nach dem Sandwich- oder kompetitiven Verfahren, erlaubt weitere Vereinfachungen des Verfahrens oder der verwendeten Apparate. Beispielsweise ist es nun möglich, als Detektor eine Photodiode zu verwenden, die Systemkalibration zu vereinfachen, wegen der geringeren Meßzeit bei erhöhtem Signal die Anzahl von durchgeführten Tests in der Zeiteinheit zu erhöhen oder die Probenvolumina zu verringern.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine Reagenzlösung zur Messung elektrochemischer Phänomene und insbesondere zum Nachweis von Analyten, enthaltend ein elektrochemisch oxidierbares Amin, das im oxidierten Zustand ein starkes Reduktionsmittel darstellt, welche ein Detergenz ausgewählt aus der Gruppe Fettalkoholethoxylate, Plantaren® und Octylglucosid oder ein Gemisch hiervon enthält. Zusätzlich kann noch ein Alkalichlorid in einer Konzentration von 0,1 mmol/l bis 0,5 mol/l enthalten sein und/oder der pH-Wert zwischen 6,8 - 8,0 liegen. Weiterhin können noch übliche Zusatzstoffe, wie beispielsweise Puffersubstanzen, Stabilisatoren und Konservierungsmittel, enthalten sein.

Die Reagenzlösung wird bevorzugt mit Bioban oder Oxaban konserviert.

Ein Apparat zur Durchführung von Nachweisen mittels Elektrochemilumineszenz ist beispielsweise in Beispiel 1 der WO 90/05302 ausführlich beschrieben. Ein Apparat kann darüber hinaus ein Mittel zur Kühlung der Meßeinheit

oder/und eines Flüssigkeitsbehälters auf Temperaturen zwischen 0 - 25 °C enthalten, falls das Verfahren bei diesen niedrigen Temperaturen durchgeführt werden soll. Als Meßeinheit soll hier die Zelle verstanden werden, in der die Messung der Elektrolumineszenz vorgenommen wird. Unter Flüssigkeitsbehälter kann ein Vorratsgefäß oder aber eine Zuführung, z. B. Schlauch, für die während der Messung in der Meßeinheit befindlichen Reagenzlösung verstanden werden.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten über eine Elektrochemilumineszenzmarkierung, wobei eines der oben genannten Verfahren zur Messung elektrochemilumineszenter Phänomene verwendet wird.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1

In einer Versuchsreihe wurde der Effekt der erfindungsgemäß eingesetzten Detergenzien ermittelt. Um den Einfluß der Detergenzien auf die Signalerzeugung möglichst unabhängig von einzelnen Testparametern, d. h. zu bestimmten Analyten bestimmen zu können, wurden streptavidinüberzogene Magnetpartikel, an denen ein biotinylierter und gleichzeitig ruthenylierter Antikörper gekoppelt war, eingesetzt (HSAP: "hot-Streptavidin-Partikel").

- 9 -

Zur Messung wurde ein Apparat, wie er in Beispiel 1 der WO 90/05302 beschrieben ist, welcher ferner in der Meßzelle einen Permanentmagneten enthielt (Origen 1.0 von IGEN, Rockville, USA oder Magnalyser) benutzt. Dieses Instrument enthält weiterhin einen Photomultiplier, einen Potentiostaten, eine elektrochemische Durchflussszelle, Flüssigkeitstransfermittel und eine 50-Tube Probenrotor.

Zum Nachweis wurden in einem Tube vereinigt:

HSAP (lyophilisierte HSAP wurden in einem Tris/Polidocanol-Puffer (100mM; 0,1%) pH 9,0 gelöst, sodaß eine Arbeitslösung von 600 µg/ml vorlag) 50 µl

PBS-Puffer (50 mM KH_2PO_4 ; 100mM NaCl; 0,1% RSA; pH 7,0) 200 µl

Reagenzlösung (200 mM KH_2PO_4 -Puffer; 100 mM TPA; pH 7,5; jeweilig getestetes Reagenz)

Dieses Gemisch wurde in ein Meßtube pipettiert und anschließend in die Meßzelle überführt. Die HSAP wurden mit dem Puffer (AB) gewaschen und in diesem Puffer die Signalausbeute vermessen.

Der verwendete Antikörper wurde mit Biotin-DDS (Biotinyl-amino-3,6-dioxaoctanoyl-aminocarbonyl-heptansäure-N-hydroxysuccinimidester) biotinyliert. (Tris)(2,2'-Bipyridyl) Rutheniumchloridhexahydrat wurde mit DSS (Disuccinylsuberat) an die Antikörper gebunden.

Die streptavidinüberzogene Magnetpartikel wurden von der Firma Deutsche Dynal GmbH, Deutschland bezogen (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Der Puffer (AB), der bei der Messung verwendet wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

KH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	0,2 M
KOH	0,076 M
NaCl	0,05 mM
TPA (Tripropylamin)	0,1 M
Detergenz	in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen
Oxaban/Bioban	0,1/0,3 %
pH	7,5

Als Kontrolle wurden die bisher üblichen Detergenzien Tween 20 und Triton X-100 jeweils in einer Konzentration von 0,05 % eingesetzt. Zum Vergleich wurde in der Tabelle 1 die mit diesem Detergenz erhaltene Signalausbeute als 100 % betrachtet. Als weiterer Meßwert wurde die unspezifische Signalausbeute im Puffer (AB) bestimmt und hiermit das Verhältnis der Signalausbeute HSAP/AB ermittelt. Dieses Verhältnis zwischen der Signalausbeute mit und ohne HSAP stellt ein gutes Indiz für die Sensitivität des Testes dar. Aus den Ergebnissen der Tabelle 1 ist klar zu erkennen, daß die erfindungsgemäßen Detergenzien am geeignetsten sind.

Polidocanol und C8-E09 zeigen den besten Einfluß auf das Verhältnis HSAP/AB. Andere Detergenzien bewirken im Vergleich zu Tween/Triton X-100 eine Verschlechterung der Signalausbeute.

Tabelle 1:

Ausgetestete Detergenzien für den ECL-assay buffer
 Elektrode: BPT3
 PMT 700 V

Detergens im Puffer	HSAP [%]	HSAP/AB [%]
0,05 % Tween 0,05 % Triton	100	100
0,1 % Polidocanol	295,1	414,5
0,4 % C14-E09	289,2	292,8
0,2 % C14-E09	346,2	308,2
0,1 % C14-E09	382	343,4
0,05 % C14-E09	402,5	342,4
0,4 % Genapol	360,1	117,8
0,2 % Genapol	377,2	129,6
0,1 % Genapol	386,5	126
0,05 % Genapol	361,5	140,1
0,4 % C8-E09	481,4	530,3
0,2 % C8-E09	402	394,7
0,1 % Plantaren	219,1	200,7
0,05 % Plantaren	270,6	276,3
0,025 % Plantaren	295,3	292,1
0,2 % Octylglucosid	286,8	390,8

Fortsetzung Tabelle 1

nicht verwertbare Detergenzien			
0,2 %	Tween 20	106,9	176,3
0,1 %	Tween 20	114,9	184,5
0,05 %	Tween 20	124,8	213,2
0,2 %	Triton X-100	62,6	68,8
0,1 %	Triton X-100	83	154,3
0,05 %	Triton X-100	115,6	195,4
0,2 %	C16-E09	17,3	36,8
0,05 %	C16-E09	50	98
0,2 %	Dodecyl-maltosid	17,7	50
0,1 %	Dodecyl-maltosid	46,9	112,5
0,2 %	SDS	4,1	5,6
0,1 %	SDS	22,9	32,9
0,2 %	Ralufon 3-14	27,3	29
0,1 %	Ralufon 3-14	27,8	31,3

Bezeichnung der verwendeten Detergenzien

C8-E09:	Octylalkoholpoly(ethyleneglycolether) _n
C14-E09:	Poly(ethyleneglycolether) _n
C16-E09:	Cetylpoly(ethyleneglycolether) _n
Dodecylmaltosid:	Dodecyl-β-D-glucopyranosyl(1->4)α-D-glucopyranoside
Genapol:	Isotridecylpoly(ethyleneglycolether) _n
Octylglucosid:	Octyl-β-D-glucopyranoside
Plantaren:	Alkylpolyglucoside (C14-C16)
Ralufon 3-14:	n-Tetradecyl-n,n-dimethyl-3-amino-1-propansulfonat
SDS:	Sodiumlaurylsulfate
Polidocanol:	Dodecylpoly(ethyleneglycolether) _n
Triton X-100:	Octylphenolpoly(ethyleneglycolether) _n
Tween:	Poly(oxyethylene)n-sorbitane-monolaurate

Beispiel 2

Am Beispiel eines Parameterunabhängigen Tests (HSAP) wird die Auswirkung der Zelltemperatur auf die Signalwiederfindung und die Dynamik für den Fall einer Rampenspannung bei 28 - 35°C in der Meßzelle in Abhängigkeit von NaCl wiedergegeben.

Der Test wurde wie im Beispiel 1 gezeigt durchgeführt. Anstatt des Puffers (AB) wurde der Puffer BMG 2 mit folgender Zusammensetzung verwendet:

H ₃ PO ₄	0,2 M
Polidocanol	0,1 %
Oxaban	0,1 %
Tripropylamin	0,16 M
KOH	0,12 M
pH	6,8
NaCl	in der Tabelle angegebene Konzentration

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt. Durch eine Erhöhung der Temperatur und der Salzkonzentration steigen die ECL-Signale, die mit Puffer (BMG2) allein und mit HSAP erhalten wurden. Die Verhältnisse HSAP/AB, HSAP/FC und FC/AB sind von der Temperatur nahezu unabhängig, dagegen von der Salzkonzentration abhängig.

Tabelle 2

a) Temperatur/Salz-Abhängigkeit des ECL-Signals

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 0 %	NaCl 0 %	NaCl 0 %
BMG 2	2479	2111	3165
FC	4378	3426	6856
HSAP	3160000	2550000	3610000
HSAP/BMG2	1257	1208	1141
HSAP/FC	722	744	626
FC/BMG 2	1,77	1,62	2,17

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 0,2 %	NaCl 0,2 %	NaCl 0,2 %
BMG 2	1963	2169	2930
FC	5072	4281	4137
HSAP	3940000	4030000	4450000
HSAP/BMG2	2007	1858	1519
HSAP/FC	777	941	1076
FC/BMG 2	2,58	1,97	1,41

- 15 -

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %
BMG 2	2208	2367	3610
FC	5280	4954	7487
HSAP	5130000	5940000	6940000
HSAP/BMG2	2323	2510	1927
HSAP/FC	972	1199	927
FC/BMG 2	2,39	2,09	2,06

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 1,8 %	NaCl 1,8 %	NaCl 1,8 %
BMG 2	2691	2970	4453
FC	5805	6129	6507
HSAP	4200000	4750000	5830000
HSAP/BMG2	1561	1599	1309
HSAP/FC	724	775	896
FC/BMG 2	2,16	2,06	1,46

- 16 -

b) Auswertung in %, bezogen auf 28 °C, 0 % NaCl

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 0 %	NaCl 0 %	NaCl 0 %
BMG 2	100,0	85,2	127,7
FC	100,0	78,3	156,6
HSAP	100,0	80,7	114,2
HSAP/BMG2	100,0	94,8	89,5
HSAP/FC	100,0	103,1	72,9
FC/BMG 2	100,0	91,9	122,7

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 0,2 %	NaCl 0,2 %	NaCl 0,2 %
BMG 2	79,2	87,5	118,2
FC	115,9	97,8	94,5
HSAP	124,7	127,5	140,8
HSAP/BMG2	157,5	145,8	119,1
HSAP/FC	107,6	130,4	149,0
FC/BMG 2	146,3	111,8	80,0

- 17 -

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %
BMG 2	89,1	95,5	145,3
FC	120,6	113,2	171,0
HSAP	162,3	188,0	219,6
HSAP/BMG2	182,3	196,9	151,2
HSAP/FC	134,6	166,1	128,4
FC/BMG 2	135,4	118,5	117,7

Temperatur °C	28	30	35
Salz-Konzentration	NaCl 1,8 %	NaCl 1,8 %	NaCl 1,8 %
BMG 2	108,6	119,6	179,6
FC	132,6	140,0	148,6
HSAP	132,9	150,3	184,5
HSAP/BMG2	122,4	125,5	102,7
HSAP/FC	100,2	107,4	124,1
FC/BMG 2	122,1	116,9	82,7

BMG 2: Kontrolle mit Probenpuffer BMG 2
 FC: Kontrolle mit freiem Konjugat
 (biotinylierter und ruthenylierter Antikörper)
 HSAP: hot-Streptavidin-Partikel

Eine Erniedrigung der Temperatur unter 20 °C erfordert einen Zusatz eines Alkalichlorids und einen pH-Wert von bevorzugt 7,25 - 7,75.

Beispiel 3Nachweis von T_3

Am Beispiel eines Immunoassays zum Nachweis von Trijodthyronin (T_3) wird die erfindungsgemäße Testzusammensetzung BMG 1 mit der Testzusammensetzung des Standes der Technik (BMG 0) verglichen:

Die Reagenzlösungen haben die folgende Zusammensetzung:

Reagenz	BMG 0	BMG 1
$KH_2PO_4 \cdot x2H_2O$	0,2 M	0,2 M
H_3PO_4	-	-
Detergenz	Triton X-100 0,005 %	Polidocanol 0,1 %
	Tween 0,05 %	
Konservierungsmittel	NaN_3 7,8 mM	Oxaban 0,1 %
Tripropylamin	0,1 M	0,1 M
KOH	0,076 M	0,076 M
pH	7,5	7,5

- 19 -

Folgende weitere Reagenzien wurden verwendet:

HEPES-Puffer 7,0: HEPES-Na pH 7,0 0,1 M
0,06 % ANS
0,1 % Rinder-IgG
0,5 % Byco
50 mM NaCl

PAK-RU (ruthenylierter polyklonaler Antikörper)
(Tris)(2,2'-Bipyridyl)Rutheniumchloridhexahydrat
gebunden mit DDS an PAK gegen T₃
in HEPES-Puffer 7,0 100 ng/ml

PH-BI (T₃-Polyhapten biotinyliert)
PH PAK <->K-IgG(DE)BOC-T₃-lBi
in HEPES-Puffer 7,0 600 ng/ml

Proben: Standard a -- e

Konzentration T₃: a: 0,24 ng/ml
b: 0,88 ng/ml
c: 1,90 ng/ml
d: 3,05 ng/ml
e: 6,65 ng/ml

3 Humanseren

2 Humanseren ohne/mit 500 mg/dl Hämoglobin (Hb)

Streptavidinbeschichtete Magnetpartikel:

Dynabeads M-280 Streptavidin
(Deutsche Dynal GmbH, Deutschland)
in HEPES-Puffer 7,0 600 µg/ml

- 20 -

Zum Nachweis wurden vereinigt:

PAK-Ru	50 μ l
Dynabeads M-280	50 μ l
Probe	30 μ l
PH-Bi	50 μ l
BMG 0 oder 1	500 μ l

Dieses Gemisch wurde 16 Minuten bei 28 °C inkubiert, anschließend in die auf 28 °C temperierte Meßzelle überführt und die Partikel mit BMG 0 oder 1 je nach Testansatz gewaschen und darin vermessen. Es wurde eine Dreiecksrampenspannung angelegt. Die Meßspannung betrug 0,565 V und das PMT 720 mV.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Hämoglobin-Störung, die im BMG 0 zu beobachten ist, im BMG 1 vermieden wird. Die untere Nachweisgrenze wird nicht beeinflusst.

Tabelle 3:

	BMG 0	BMG 1
UNG (2s)	0,3 ng/ml	0,3 ng/ml
Humanserum ohne Hb	100 %	100 %
Humanserum mit Hb	307 %	106 %

UNG (2s) = Untere Nachweisgrenze

Beispiel 4Nachweis von HBsAg

Es wurde die erfindungsgemäße Testzusammensetzung BMG 1 im Vergleich zu BMG 0 am Beispiel eines Sandwich-Immunoassays zum Nachweis von HBsAg getestet. BMG 0 und 1 hatten die im Beispiel 3 angeführten Zusammensetzungen.

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

HEPES-Puffer pH 7,5:	HEPES-Na	0,05 M
	Rinderserumalbumin	1 %
	Genapol X 080	0,1 %
	Rinder(R)-IgG	0,1 %
	Maus-IgM	10 µg/ml
	CAM (Chloracetamid)	0,1 %
	MIT (Methylisothiazolon)	0,01 %

AK-Bi (Antikörper mit Biotin-DDS biotinyliert)
 MAK<HBs>M5A10-IgG-Bi (DDS)
 1:7,5 in HEPES-Puffer pH 7,5 300 ng/ml

TAG (ruthenylierter Antikörper)
 MAK<HBs>M5A10-F(ab')₂-BPRU
 (Tris) (2,2'-Bipyridyl) Rutheniumchloridhexahydrat
 gebunden mit DSS an monoklonalen Antikörper gegen
 HBsAG (F(ab')-Fragment)
 in HEPES-Puffer pH 7,5 500 ng/ml

- 22 -

Proben: Standard a-h

Konzentration HBSAg	a:	0	E/ml
	b:	0,22	E/ml
	c:	0,52	E/ml
	d:	1,08	E/ml
	e:	2,30	E/ml
	f:	4,50	E/ml
	g:	10,30	E/ml
	h:	22,20	E/ml

Streptavidinbeschichtete Magnetpartikel:

Dynabeads M-280 Streptavidin

in HEPES-Puffer pH 7,5

600 µg/ml

Zum Nachweis wurden vereinigt:

Dynabeads M-280	50 µl
AK-Bi	50 µl
TAG	40 µl
Probe	50 µl
HEPES-Puffer pH 7,5	20 µl
BMG 0 oder 1	150 µl

Dieses Gemisch wurde 16 Minuten bei 28 °C inkubiert, anschließend in die auf 28 °C temperierte Meßzelle überführt und die Partikel mit BMG 0 oder 1 gewaschen und darin vermessen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt. Durch die Verwendung von BMG 1 konnte die untere Nachweisgrenze deutlich verbessert werden. Ebenfalls wurde im Vergleich zu

BMG 0 der VK erniedrigt. Das Verhältnis der Werte der Standardproben h zu a der Eichkurve ist bei BMG 1 erhöht, wodurch eine bessere Differenzierung der Eichkurve erreicht wird.

Tabelle 4:

	BMG 0	BMG 1
UNG [E/ml]	0,21	0,06
Standard h/a	40	78
VK [%]	6,9	4,3

UNG = Untere Nachweisgrenze

VK: = Variationskoeffizient

Beispiel 5Nachweis von TSH

Am Beispiel eines Sandwich-Immunoassays zum Nachweis von TSH (Thyroid-stimulierendes Hormon) werden die erfindungsgemäßen Testzusammensetzungen BMG 1 und BMG 1 ohne Oxaban im Vergleich zur Testzusammensetzung nach dem Stand der Technik BMG 0 verglichen. BMG 0 und 1 hatten die in Beispiel 3 beschriebene Zusammensetzung.

Thyroid-stimulierendes Hormon (TSH) wurde über einen Sandwich-Immunoassay bestimmt. Zur Ausführung kam hierbei ein Apparat, wie in Beispiel 1 beschrieben ist.

Zum Nachweis wurden vereinigt:

Inkubationspuffer

(enthaltend 6.06 g/l Tris x HCl,	50 µl
1 g/l Chloracetamid, 0,1 g/l	
Methylisothiazolon, pH 8.0, 50 g/l	
Rinderserumalbumin, 10 g/l R-IgG)	

Streptavidinüberzogene

Magnetpartikel (Dynal, 2,8 µm)	
im Inkubationspuffer	600 µg/ml 40 µl

mit DSS (Disuccinidyl Suberat)

biotinylierter monoklonaler

Antikörper (MAK) gegen TSH

im Inkubationspuffer	3,0 µg/ml 40 µl
----------------------	-----------------

TAG:

(Tris) (2,2'-Bipyridyl) Ruthenium-
chloridhexahydrat gebunden mit DSS

an MAK gegen TSH im Inkubationspuffer	1,2 µg/ml 40 µl
---------------------------------------	-----------------

- 25 -

Probenflüssigkeit bzw. Standard

50 μ lResuspension (Zugabe von Reagenzlösung (BMG1) 100 μ l

Dieses Gemisch wurde 16 Minuten bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert und anschließend in die auf die gewünschte Meßtemperatur gebrachte Meßzelle überführt, die immobilisierten Partikel mit Reagenzlösung BMG1 gewaschen und in BMG1 vermessen.

Als Probe wurden die Standards a - e mit TSH-

Konzentrationen von a: 0 μ U/ml

b: 0,39 μ U/ml

c: 3,54 μ U/ml

d: 12,4 μ U/ml

e: 44,3 μ U/ml

verwendet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 wiedergegeben. Durch BMG 1 wird im Vergleich zu BMG 0 eine bessere Nachweisgrenze erreicht. Durch Zusatz des Konservierungsmittels Oxaban wird die untere Nachweisgrenze weiter herabgesetzt. Eindeutig verbessert wird in beiden Beispielen (BMG 1 +/- Oxaban) ebenfalls der Variationskoeffizient.

Tabelle 5:

	BMG 0	BMG 1	BMG 1 ohne Oxaban
UNG (2s) [mIU/ml]	0,049	0,028	0,041
VK [%]	3,35	2,28	2,38

Die Abkürzungen haben die in Beispiel 4 genannten Bedeutungen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Messung elektrochemilumineszenter Phänomene in einer Lösung oder aus einer an die Lösung angrenzenden festen Phase dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein Detergenz ausgewählt aus der Gruppe Fettalkoholethoxylate, Plantaren und Octylglucosid oder ein Gemisch hiervon enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Fettalkoholethoxylat Polidocanol, C14-E09, Genapol oder C8-E09 verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein oder mehrere Alkali- oder Erdalkalihalogenide enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der pH der Lösung zwischen 6,5 und 9,0 liegt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrochemilumineszenz durch Anlegen einer Rechtecks-Spannung von maximal 2,2 Volt oder einer Rampenspannung von maximal 3,0 Volt angeregt wird.
6. Reagenzlösung zur Messung elektrochemischer Phänomene enthaltend ein elektrochemisch oxidierbares Amin, das im oxidierten Zustand ein starkes Reduktionsmittel darstellt, dadurch gekennzeichnet, daß ein Detergenz ausgewählt aus der Gruppe Fettalkoholethoxylat, Plantaren und Octylglucosid oder ein Gemisch hiervon enthalten ist.

- 27 -

7. Reagenzlösung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergenz in einer Konzentration von 0,001 bis 1% enthalten ist.
8. Reagenzlösung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Alkalichlorid in einer Konzentration von 0,05 mmol/l bis 0,5 mol/l enthalten ist.
9. Reagenzlösung nach Anspruch 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pH zwischen 6,5 und 9,0 aufweist.
10. Verfahren zum Nachweis eines Analyten über eine Elektrochemilumineszenzmarkierung, dadurch gekennzeichnet, daß zur Messung der Elektrochemilumineszenz ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 5 verwendet wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 94/01328A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 G01N21/66 G01N33/52 //G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 096 749 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 28 December 1983 see page 6, line 15 - line 33 ---	1-10
A	US,A,4 927 769 (S.C.S. CHANG ET AL.) 22 May 1990 ---	
A	JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, vol.54, no.3, 1990, LAUSANNE pages 311 - 319 H. KARATANI ET AL. 'ELECTROGENERATED CHEMILUMINESCENCE OF CYCLIC HYDRAZIDES IN AN ALKALINE BRIJ35 MICELLAR SYSTEM.' ---	
A	WO,A,90 05296 (IGEN INC.) 17 May 1990 cited in the application --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 August 1994

Date of mailing of the international search report

27.09.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cartagena y Abella,P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. International Application No
PCT/EP 94/01328

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,90 05302 (IGEN INC.) 17 May 1990 cited in the application -----	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/01328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0096749	28-12-83	US-A- 4462931 CA-A- 1197508 JP-C- 1679308 JP-B- 3042319 JP-A- 59006277	31-07-84 03-12-85 13-07-92 26-06-91 13-01-84
US-A-4927769	22-05-90	NONE	
WO-A-9005296	17-05-90	AU-B- 641374 AU-A- 4657289 AU-B- 5269793 CA-A- 2002099 EP-A- 0441894 JP-T- 4502964	23-09-93 28-05-90 10-03-94 03-05-90 21-08-91 28-05-92
WO-A-9005302	17-05-90	AU-B- 644779 AU-A- 4620089 CA-A- 2002083 EP-A- 0441875 JP-T- 4502208	23-12-93 28-05-90 03-05-90 21-08-91 16-04-92

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 5 G01N21/66 G01N33/52 //G01N33/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 5 G01N

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beur. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 096 749 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 28. Dezember 1983 siehe Seite 6, Zeile 15 - Zeile 33 ---	1-10
A	US,A,4 927 769 (S.C.S. CHANG ET AL.) 22. Mai 1990 ---	
A	JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, Bd. 54, Nr. 3, 1990, LAUSANNE Seiten 311 - 319 H. KARATANI ET AL. 'ELECTROGENERATED CHEMILUMINESCENCE OF CYCLIC HYDRAZIDES IN AN ALKALINE BRIJ35 MICELLAR SYSTEM.' ---	
A	WO,A,90 05296 (IGEN INC.) 17. Mai 1990 in der Anmeldung erwähnt --- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"I" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. August 1994

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27. 09. 94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cartagena y Abella, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beur. Anspruch Nr.
A	WO,A,90 05302 (IGEN INC.) 17. Mai 1990 in der Anmeldung erwähnt -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

I. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/01328

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
EP-A-0096749	28-12-83	US-A-	4462931	31-07-84
		CA-A-	1197508	03-12-85
		JP-C-	1679308	13-07-92
		JP-B-	3042319	26-06-91
		JP-A-	59006277	13-01-84

US-A-4927769	22-05-90	KEINE		

WO-A-9005296	17-05-90	AU-B-	641374	23-09-93
		AU-A-	4657289	28-05-90
		AU-B-	5269793	10-03-94
		CA-A-	2002099	03-05-90
		EP-A-	0441894	21-08-91
		JP-T-	4502964	28-05-92

WO-A-9005302	17-05-90	AU-B-	644779	23-12-93
		AU-A-	4620089	28-05-90
		CA-A-	2002083	03-05-90
		EP-A-	0441875	21-08-91
		JP-T-	4502208	16-04-92

Formblatt PCT/ISA 210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)